



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

СУ (11) 1602869 А1

(51) 5 С 12 Q 1/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ПМНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4426085/31-13

(22) 16.05.88

(46) 30.10.90. Вол. № 40

(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт биологического приборостроения

(72) Н. С. Осин

(53) 577.15(088.8)

(56) Петухов В. Г., Осин Н. С. Длительная люминесценция микроорганизмов: природа и применение. — Успехи микробиологии, 1989, т. 23.

Авторское свидетельство СССР № 1339130, кл. С 12 Q 1/02, 1987.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

(57) Изобретение может быть использовано в биотехнологии при производстве препаратов путем микробиологического синтеза. Целью изобретения является повышение чувствительности и упроще-

Изобретение относится к микробиологии и может найти применение в биотехнологии при производстве препаратов путем микробиологического синтеза.

Цель изобретения — повышение чувствительности способа и его упрощение.

Способ заключается в том, что в пробу вводят длиннолюминесцирующий ($c \geq 10^{-4}$ с) флуорохром на носителе ковалентно и/или сорбционно связанный с ним, регистрируют кинетику изменения уровня сигнала длительной люминесценции, а дыхательную активность рассчитывают по формуле

2
ние способа. В кварцевую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой пробы с Е. со-11 М-17 в виде водной суспензии с концентрацией клеток 10^9 микробных тел в 1 мл и 10 мкл бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанныго с цинкпротопорфирином IX. Концентрация белка 1 мг/мл, соотношение белок — флуорохром 1:10 (в молях). Пробу помещают в кюветное отделение флуориметра с временным разрешением, облучают видимым светом от лампы накаливания и регистрируют фотоприемником кинетику изменения сигнала длительной люминесценции с $c > 10^{-4}$ с в процессе поглощения кислорода. Способ заключается во введении длиннолюминесцирующего (с $c > 10^{-4}$ с) флуорохрома на носителе и измерении кинетики изменения сигнала с последующей оценкой результата по формуле. 1 ил., 1 табл.

$$V_0 = \frac{1}{K_4} \frac{4,5}{2,2 \Delta t_1 - 0,8 \Delta t_2}$$

где K_4 — константа тушения флуорохрома кислородом;

Δt_1 — интервал времени, за который уровень длительной люминесценции увеличился от 0,1 I_0 до 0,2 I_0 (I_0 — уровень максимального свечения пробы после поглощения из среды кислорода);

Δt_2 — интервал времени, соответствующий возрастанию интен-

СУ (11) 1602869 А1

сивы сти люминесценции с 0,1 I_6 до 0,5 I_6 .

В качестве флуорхромов используют широкий набор длиннолюминесцирующих с единений (ароматические углеводороды, гетероциклические соединения, например порфирины и их металлокомплексы, пирен, бензопирен, флавины и их производные). В качестве носителей используют белки, ковалентно или адсорбционно связанные с флуорхромом, латексные частицы и другие сорбенты.

Использование в качестве индикатора флуорхрома на носителе резко увеличивает его способность к длительной люминесценции за счет устранения тушения действия воды.

Предлагаемый способ обеспечивает повышение чувствительности. Это обеспечивается двумя факторами: исключением дозирования кислорода с помощью водного раствора и введением в пробу индикатора с известной характеристикой тушения кислородом его длительной люминесценции. Введение этих операций позволяет резко уменьшить объем анализируемых проб до единиц микролитров, т.е. повысить чувствительность анализа.

Оптимальным диапазоном для регистрации I_1 , I_2 , I_3 является диапазон от 0,1 I_6 до 0,5 I_6 . Это связано с тем, что при $I_1 < 0,1 I_6$ возрастает ошибка от вклада длиннолюминесцирующих примесей, а при $I_3 > 0,1 I_6$ у микроорганизмов может существовать альтернативный путь поглощения кислорода, вклад от которого заметен лишь при крайне низких концентрациях кислорода.

Вклад альтернативного пути поглощения кислорода становится заметным при $I > 0,5 I_6$, т.е. при концентрациях кислорода, много меньших константы Михаэлиса основного пути.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1. Металлопорфирин (флуорхром) растворяют в воде (10^{-4} М) и смешивают с карбодимидом в соотношении 1:2 (М), после 30 мин инкубации при комнатной температуре в реакционную смесь добавляют белок (бычий сывороточный альбумин) в молярном отношении 10:1 (флуорхром:белок). Через 4 ч инкубации гельфильтрацией на колонке с сепадексом G-50 отделяют конъюгат от свободного (несвязавшегося)

металлопорфирина. В качестве элюента используют трис-буфер (рН 7,2). Конъюгат (флуорхром-белок) разливают в отдельным ампулам и высушивают лиофиль.

Пример 2. Один из флуорхромов (эозин, бензопирен, пирен, металлопорфирин) растворяют в воде (10^{-4} М) и смешивают с меламиноформальдегидной смесью по известному способу. Затем проводят отмыкку латексов от несвязавшегося флуорхрома седиментацией или центрифугированием. Латексы хранят в виде водного раствора.

Пример 3. Латексы с флуоресцентной меткой на основе полистирола получают смешиванием флуорхрома с эмульсией стирола с последующей его полимеризацией.

Затем реакционную смесь освобождают центрифугированием или седиментацией от свободного флуорхрома. Латексы хранят в виде эмульсии или лиофильно высушенных частиц.

Пример 4. В кварцевую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой пробы с *E. coli* M-17 в виде водной суспензии с концентрацией клеток 10^9 микробных тел в мл (м.т./мл) и 10 мкл бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанного с цинкпротопорфирином IX. Концентрация белка 1 мг/мл, соотношение белок:флуорхром 1:10 (в молях).

Пробу помещают в кюветное отделение флуориметра с временным разрешением, облучают видимым светом (400-700 нм) от лампы накаливания марки КГМ 15 Вт и фотоприемником ФЭУ-114 регистрируют кинетику изменения сигнала длительной люминесценции ($c \cdot t > 10^{-4}$ с) в процессе поглощения кислорода.

На чертеже представлена кинетика (А) изменения сигнала длительной люминесценции в процессе поглощения кислорода.

Находят время увеличения сигнала с 0,1 до 0,2 I_6 и до 0,5 I_6 , равное 1 и 2 мин соответственно. С учетом константы тушения K_d для цинкпротопорфирина IX, равной $1,6 \cdot 10^7$ м³, по формуле получают величину дыхательной активности микроорганизмов в пробе, равную $0,47 \cdot 10^{-6}$ М [С₂]/мин $\cdot 10^9$ м.т.

Пример 5. Способ осуществляют аналогично примеру 1. В качестве флуорхрома используют пирен, в каче-

ств и ситец - частицы полистирола диаметром 5-20 мкм. Концентрация пигmenta в пробе 10^{-5} М.

На чертеже представлена кинетика изменения сигнала длительной люминесценции флуорокрома в процессе поглощения кислорода из пробы. С учетом константы тушения для данного флуорокрома $K_q = 8 \cdot 10^6 \text{ м}^{-1}$, а времена $\Delta t_1 = 0,57 \text{ мин}$, $\Delta t_2 = 1,08 \text{ мин}$ расчетом по формуле находят дыхательную активность микроорганизмов в пробе, равную $0,47 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2]/\text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$

Из сравнительных данных примеров 1 и 2 видно, что независимо от типа используемого флуорокрома и носителя скорость поглощения кислорода в обоих случаях оказалась равной.

При мер 6. Ампулу с вакциной БИЖ (1 мг сухой биомассы) вскрывают и разводят дистиллированной водой (0,2 мл). После регистрации в течение 15 мин супензии микроорганизмов переносят в измерительную ампулу диаметром 5 мм и вносят 10 мкл меламинформальдегидных латексов ($2,5 \cdot 10^8 \text{ мл}$) с трипрафлавином ($3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$). Время восстановления люминесценции от 0,1 $\text{I}_{\text{макс}}$ до уровня 0,2 $\text{I}_{\text{макс}}$ составило 9 мин, а до уровня 0,5 $\text{I}_{\text{макс}}$ 16 мин соответственно. С учетом константы тушения $K_q = 2 \cdot 10^7 \text{ м}^{-1}$ для трипрафлавина скорость поглощения кислорода, рассчитанная по формуле, составляет

$$V_o = \frac{1}{2 \cdot 10^7} \cdot \frac{4,5}{2,2 \cdot 9 - 0,8 \cdot 16} = \\ = 0,5 \cdot 10^{-7} \cdot \frac{4,5}{19,8 - 10,8} = \\ = 0,25 \cdot 10^{-7} \text{ М} [\text{O}_2]/\text{мин}/\text{мг сух.} \\ \text{массы}$$

При мер 7. В кварцевую пробирку диаметром 2 мм вносят 5 мкл пробы, содержащей 10^5 клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и 2 мкл коньюгата бычьего сывороточного альбумина с $\text{Al}(\text{OH})$ -компропорфирином в концентрации 10 мг/мл. и молярном соотношении белок:порфирин 1:10.

Пробирку с пробой помещают в кюветное отделение флуориметра с временным разрешением, блужают видимым светом т лампы накаливания КГМ 15 Вт и фото-приемник м ФЭУ-114 регистрируют кинетику изменения сигнала длительной лю-

минесценции ($\text{с} \cdot \text{с} > 10^{-4} \text{ с}$) в процессе поглощения кислорода. На чертеже представлена кинетика (В) изменения сигнала в процессе поглощения кислорода. Расчетом по формуле с учетом $\Delta t_1 = 2 \text{ мин}$, а $\Delta t_2 = 4 \text{ мин}$ и константы тушения для данного флуорокрома, равной $K_q = 1,8 \cdot 10^7 \text{ м}^{-1}$, находят дыхательную активность микроорганизмов в пробе, равную $2,8 \cdot 10^{27} \text{ М} [\text{O}_2]/\text{мин} \cdot 10^5 \text{ м.т.}$

В таблице представлены данные по сравнительной с известным способом оценке чувствительности предлагаемого. В качестве флуорокрома на носителе использовали $\text{Al}(\text{OH})$ на бычьем сывороточном альбумине.

Из данных таблицы видно, что предлагаемый способ позволяет повысить чувствительность анализа за счет резкого уменьшения объема анализируемых проб. При уменьшении объема пробы с 1 мл до 0,1 мл в прототипе заметно увеличивается ошибка определения, связанная с некорректностью приема дозирования кислорода.

Таким образом, предлагаемый способ может быть использован для решения различных задач в области биотехнологии, где необходимо производить оценку дыхательной активности в малых объемах проб с низкой концентрацией клеток или с низким уровнем дыхательной активности.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения дыхательной активности микроорганизмов путем введения в пробу флуорокромов, облучения пробы светом и регистрации кинетики изменения сигнала длительной люминесценции с последующей оценкой результата, отличающийся тем, что, с целью повышения чувствительности и упрощения анализа, из флуорокромов используют длинополюминесцирующий флуорокром с $\text{с} \cdot \text{с} > 10^{-4} \text{ с}$ на носителе, а оценку результата ведут по формуле

$$V_o = \frac{1}{K_q} \cdot \frac{4,5}{2,2 \Delta t_1 - 0,8 \Delta t_2}$$

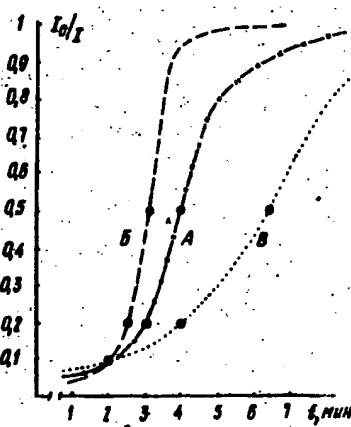
где V_o - дыхательная активность; K_q - константа тушения люминесценции флуорокрома кислородом, м⁻¹;

Δt_1 - интервал времени, соответствующий увеличению сигнала люминесценции от $0,1 I_0$ до $0,2 I_0$, I_0 - максимальный уровень люминесценции про-

бы после поглощения кислорода;

Δt_2 - интервал времени, соответствующий увеличению уровня люминесценции от $0,1 I_0$ до $0,5 I_0$.

Состав пробы, микроорганизм	Концентрация (микробных тел/мл)	Объем пробы, мл	Результаты анализа по способу	
			известному	предлагаемому
<i>E. coli</i> M-17	10^9	2	$0,52 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$	$0,47 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>E. coli</i> M-17	10^9	0,5	$0,60 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$	$0,47 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>E. coli</i> M-17	10^9	0,1	$0,75 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$	$0,48 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>E. coli</i> M-17	10^9	0,005	Не определяется	$0,49 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$
<i>Sacch. cerevisiae</i>	10^6	0,005	- " -	$0,7 \cdot 10^{-7} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^6 \text{ м.т.}$
<i>Alcaligenes faecalis</i>	10^9	0,005	- " -	$0,2 \cdot 10^{-6} \text{ М} [\text{O}_2] / \text{мин} \cdot 10^9 \text{ м.т.}$



Составитель А. Калякин
Редактор Н. Киптулининец Техред Л. Сердюкова Корректор Т. Колб

Заказ 3360

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Тираж 484

Подписанное

Пр изводственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101

WEST

Number of documents to display is limited to 10 for FULL format

Search Results - Record(s) 1 through 1 of 1 returned.

 1. Document ID: SU 1602869 A

L1: Entry 1 of 1

File: DWPI

Oct 30, 1990

DERWENT-ACC-NO: 1991-199198

DERWENT-WEEK: 199127

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Determining respiratory activity of microorganisms - by addn. of persistent luminescent cpd. exposure to light, measuring kinetics of signal change, and use of formula

INVENTOR: OSIN, N S

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE	CODE
BIOLOGY INSTRUMENTS	BIOLR

PRIORITY-DATA: 1988SU-4426085 (May 16, 1988)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<u>SU 1602869 A</u>	October 30, 1990		000	

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
SU 1602869A	May 16, 1988	1988SU-4426085	

INT-CL (IPC): C12Q 1/02

ABSTRACTED-PUB-NO: SU 1602869A

BASIC-ABSTRACT:

Respiratory activity (V) of microorganisms is determined more efficiently as follows. A persistent (t of at least 0.1 msec.) fluorochrome on support is added to the sample contg. the microorganisms, exposed to light, and kinetics of the signal change is measured. The activity V is then calculated using the formula $V=(1/Kq) \cdot 4.5 / (2.2dt1 - 0.8dt2)$, where Kq is the quenching const. of the fluorochrome by O₂, dt1 and dt2 are the times of growth of persistent luminescence from 0.1 to 0.2 IO and from 0.1 to 0.5 IO, and IO is the level of max. luminescence after the absorption of O₂ from the medium.

USE/ADVANTAGE - In biotechnology for prodn. of preparations by microbiological synthesis. Simpler determinn., increased accuracy. Bul.40/30.10.90

CHOSEN-DRAWING: Dwg. 0/1

TITLE-TERMS: DETERMINE RESPIRATION ACTIVE MICROORGANISM ADD PERSISTENT LUMINESCENT COMPOUND EXPOSE LIGHT MEASURE KINETIC SIGNAL CHANGE FORMULA

DERWENT-CLASS: D16 J04 S03

CPI-CODES: D05-H09; J04-C03;

EPI-CODES: S03-E04E; S03-E14H9;

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 1779U

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1991-086478

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1991-152211

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Sequences	Attachments	Claims	KMC
Draw Desc Image											

[Generate Collection](#)

[Print](#)

Terms	Documents
su-1602869\$ did.	1

Display Format: [FULL](#) [Change Format](#)

[Previous Page](#) [Next Page](#)